

Durchflußzytometrische Analytik von Liquor cerebrospinalis

Müller, H. A. G.; Toellner, K.-m.; Hiendlmayer, G.

DOI:

[10.1515/labm.1991.15.2.69](https://doi.org/10.1515/labm.1991.15.2.69)

License:

None: All rights reserved

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Citation for published version (Harvard):

Müller, HAG, Toellner, K & Hiendlmayer, G 1991, 'Durchflußzytometrische Analytik von Liquor cerebrospinalis', *LaboratoriumsMedizin*, vol. 15, no. 2, pp. 69-72. <https://doi.org/10.1515/labm.1991.15.2.69>

[Link to publication on Research at Birmingham portal](#)

Publisher Rights Statement:

Published as: Müller, H. A. G., K-M. Toellner, and G. Hiendlmayer. "Durchflußzytometrische Analytik von Liquor cerebrospinalis." *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine* 15.2 (1991): 69-72.

Available online: <http://dx.doi.org/10.1515/labm.1991.15.2.69>

General rights

Unless a licence is specified above, all rights (including copyright and moral rights) in this document are retained by the authors and/or the copyright holders. The express permission of the copyright holder must be obtained for any use of this material other than for purposes permitted by law.

- Users may freely distribute the URL that is used to identify this publication.
- Users may download and/or print one copy of the publication from the University of Birmingham research portal for the purpose of private study or non-commercial research.
- User may use extracts from the document in line with the concept of 'fair dealing' under the Copyright, Designs and Patents Act 1988 (?)
- Users may not further distribute the material nor use it for the purposes of commercial gain.

Where a licence is displayed above, please note the terms and conditions of the licence govern your use of this document.

When citing, please reference the published version.

Take down policy

While the University of Birmingham exercises care and attention in making items available there are rare occasions when an item has been uploaded in error or has been deemed to be commercially or otherwise sensitive.

If you believe that this is the case for this document, please contact UBIRA@lists.bham.ac.uk providing details and we will remove access to the work immediately and investigate.

Durchflußzytometrische Analytik von Liquor cerebrospinalis

Flow Cytometry of Cerebrospinal Fluid (CSF)

H. A. G. Müller¹, K.-M. Toellner², G. Hiendlmayer³

¹ Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinik am Eichert, Göppingen

² Institut für Genetik u. Virologie, Universität Hohenheim, Stuttgart

³ Klinisch Chemische Abteilung, Bürgerhospital, Stuttgart

Zusammenfassung:

Es werden zwei Modifikationen einer durchflußzytometrischen Methode zur Analyse von Lymphozyten des Liquor cerebrospinalis beschrieben. Beide Modifikationen benutzen einen DNS-Farbstoff zur selektiven Markierung kernhaltiger Zellen, um dadurch eine Überlagerung durch Erythrozyten zu eliminieren. Bei Verwendung eines Durchflußzytometers mit zwei Anregungswellenlängen (488 nm und 351–364 nm) wird der Farbstoff DAPI, bei nur einer Anregungswellenlänge (488 nm) der Farbstoff LDS751 verwendet. Die Verwendung von DAPI ermöglicht darüber hinaus, die Analyse auf lebende Zellen zu beschränken. Die Lagerzeit der isolierten Lymphozyten des Liquors darf 12 Stunden nicht überschreiten. Die wechselnde Zahl der Liquorzellen erfordert je nach Antikörper unterschiedliche Mengen von Antikörpern und Waschzyklen. Die Richtigkeit der Analytik unter Verwendung der DNS-Farbstoffe wird durch Vergleich mit Markierungen an isolierten Blutlymphozyten dargestellt.

Schlüsselwörter:

Liquor cerebrospinalis – Lymphozyten – Durchflußzytometrie – DNS-Farbstoffe

Summary:

Two modifications of a low-cytometric method for the analysis of CSF lymphocytes are described. Both modifications use a DNA staining procedure to mark nucleated cells and thus eliminating an overlapping of lymphocytes by erythrocytes. DAPI is used for a flow-cytometer with two excitation wave-lengths (488 nm and 351–364 nm) and LDS751 for a flow-cytometer with a single excitation wave-length (488 nm). Using DAPI as a DNA stain it is possible to restrict the analysis to living cells. The short survival period of lymphocytes in the cerebrospinal fluid makes an immediate analysis of the isolated cells essential. Alterations of cell number in CSF samples are the reason for using special amounts of antibodies and wash cycles. The results are compared with stainings of isolated blood lymphocytes.

Keywords:

Cerebrospinal fluid – lymphocytes – flow-cytometer – DNA-stains

Einleitung:

Der Liquor cerebrospinalis ist eine protein- und zellarme Flüssigkeit, die nur in sehr beschränkter Menge für die Analytik zur Verfügung steht. Die meisten durchflußzytometrischen Methoden beschäftigen sich mit der multiparametrischen Analyse zellreicher Flüssigkeiten. Vorzüge der Durchflußzytometrie sind: Analytik großer Zellzahlen, multiparametrische Analytik, quantitative Messung der Fluoreszenzintensitäten, hohe Analysengeschwindigkeit und ein hoher Grad an Automatisierbarkeit. Die bisherige Analytik der Zellen des Liquors benutzt die klassischen Methoden der Zellzählung und der histologischen und immunologischen Aufbereitung von Zytocentrifugenpräparationen (1). Die dargestellte Methode soll einerseits die Vorzüge der Durchflußzytometrie nutzen und andererseits die unabänderlichen Beschränkungen des Materials Liquor berücksichtigen. Dazu gehö-

ren die kurze Überlebenszeit der Liquorzellen, ihre Empfindlichkeit gegenüber Lyseagenzien, die starke Variation der Zellzahl und das Problem des Rauschsignals durch andere Zellen (2).

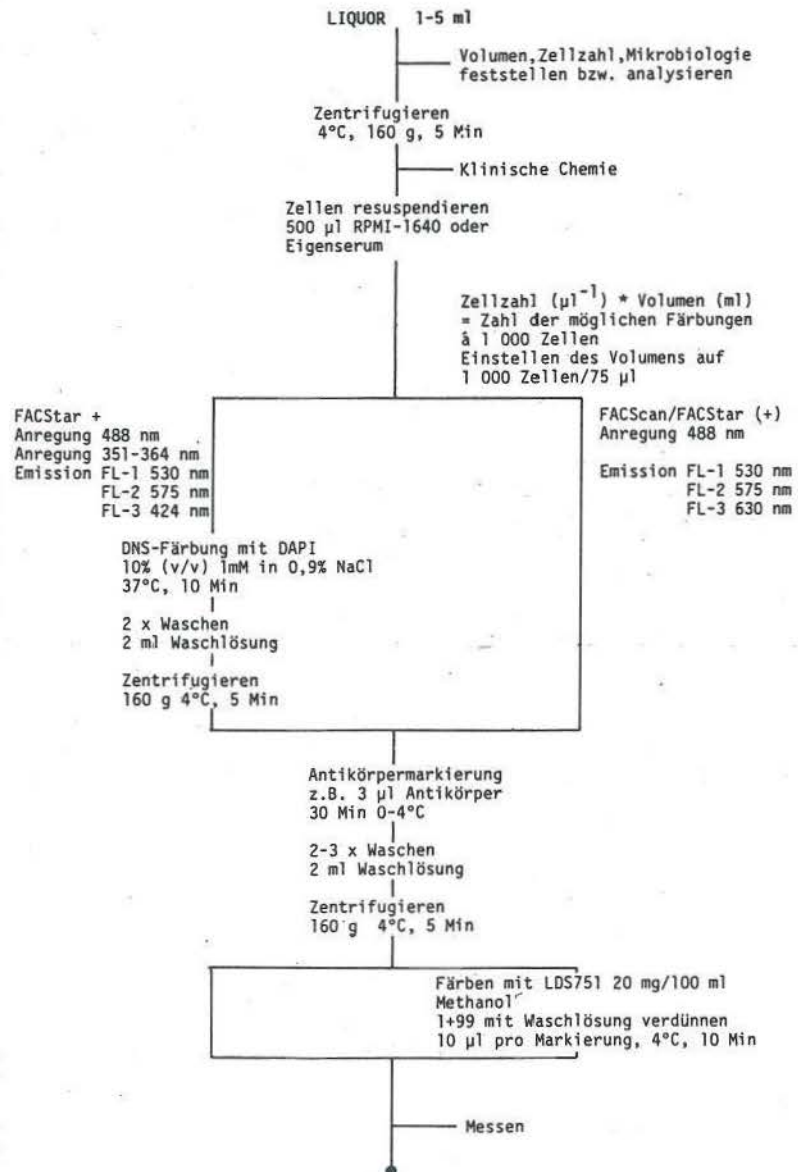


Tabelle 1: Zusammenfassung beider Modifikationen des Analysenprotokolls. Links die FACStar + Modifikation, rechts die FACScan-Modifikation. Beide unterscheiden sich durch die Wahl des Farbstoffes, die Färbetemperatur und den Zeitpunkt der Färbung. Der Farbstoff DAPI trennt die Zellen in DAPI-negative (Erythrozyten), schwach-DAPI-positive (lebende kernhaltige) Zellen und DAPI-positive (tote kernhaltige) Zellen auf. Mit LDS751 werden lediglich kernhaltige von kernlosen Zellen abgetrennt.

Verwendete Abkürzungen:

FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin, CD = Cluster of Differentiation, PBS = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, RPMI-1640 = Rosewell-Park Memorial Institut 1640.

Material und Methoden:

Es wurden zwei Durchflußzytometer, ein Zellsorter „FACStar plus (R)“ und ein rein analytisch arbeitendes Gerät, „FACScan (R)“, benutzt (beide Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg).

1. FACStar plus:

Laser: 5 Watt wassergekühlter Argonlaser mit UV-Anteil (Fa. Coherent, Ober-Roden).

Fluoreszenzanregung: 488 nm und 351–364 nm

Dichroitische Spiegel: DM 560 und DM 505

Software: FACStar plus Research Software

Düsenöffnung: 60 µm

2. FACScan:

Laser: 15 mWatt luftgekühlter Argonlaser

Fluoreszenzanregung: 488 nm

Software: FACScan Research Software

Tabelle 1 zeigt das Analysenprotokoll beider Modifikationen. Die Modifikation mit dem DNS-Farbstoff LDS751 kann auch am Gerät FACStar plus ohne zusätzliche UV-Wellenlänge benutzt werden.

Mit der entsprechenden Software (FACStar plus Research Software oder FACScan Research Software) wurden die Zellen in einem „Life-Gate“, das alle LDS751-positiven bzw. alle schwach-DAPI-positiven Zellen enthält, gemessen. Anschließend wurden die Lymphozyten durch ein zweites „Gate“ elektronisch ausgeblendet und die Fluoreszenz der beiden Antikörper bestimmt. Die Prozentsätze der markierten Zellen wurden berechnet.

Untersucht wurden die Antikörperkombinationen:

Probenleerwert ohne Antikörper bzw. mit isotypischen Kontrollen markiert.

CD4 (Leu-3) FITC-markiert und CD8 (Leu-2) PE-markiert.
CD3 (Leu-4) FITC-markiert und CD38 (Leu-17) PE-markiert.
CD45 (HLeu-1) FITC-markiert und CD14 (Leu-M3) PE-markiert.
CD2 (Leu-5) FITC-markiert und CD19 (Leu-12) PE-markiert.
TLiSA1 FITC-markiert und CD3 (Leu-4) PE-markiert.
CD45r (Leu-18) FITC-markiert und CD8 (Leu-3) PE-markiert.
CD 57 (Leu-7) FITC-markiert und CD16 (Leu-11) PE-markiert.
VLA1 FITC-markiert und CD3 (Leu-4) PE-markiert.
(Leu-Serie von Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg; TLiSA1 und VLA1 von Fa. T-Cell Science, Cambridge, MA, USA; TA1 von Fa. Coulter, Krefeld).

Spezifitäten der eingesetzten Antikörper:

CD2 (Leu-5) T-Zellen; Sheep Red Blood Cell-Rezeptor
CD3 (Leu-4) T-Zellen; T-Cell-Rezeptor-Komplex
CD4 (Leu-3) T-Helfer-Inducer-Zellen
CD8 (Leu-2) T-Suppressor-cytotoxische-Zellen
CD14 (Leu-M3) reife Monozyten und Makrophagen
CD16 (Leu-11) Fc-IgG Rezeptor von NK-Zellen
CD19 (Leu-12) pan-B-Zellen
CD38 (Leu-17) mitogen aktivierte T-Zellen
CD45 (HLe-1) pan-Leukozyten
CD45r (Leu-18) T-Subset; naive T-Zellen

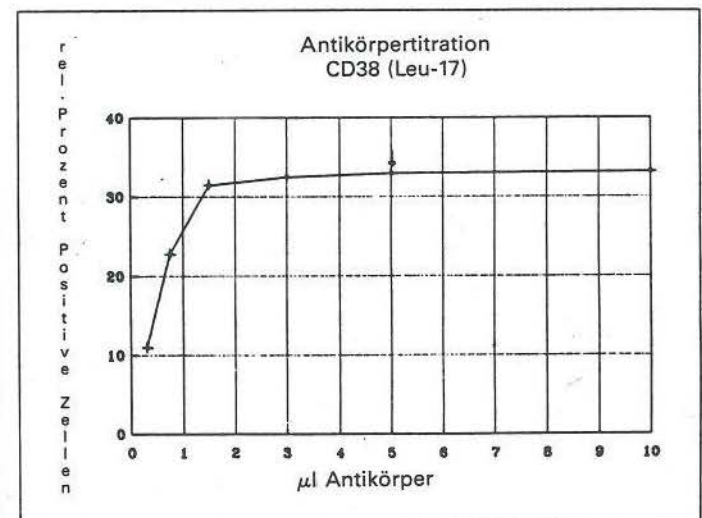
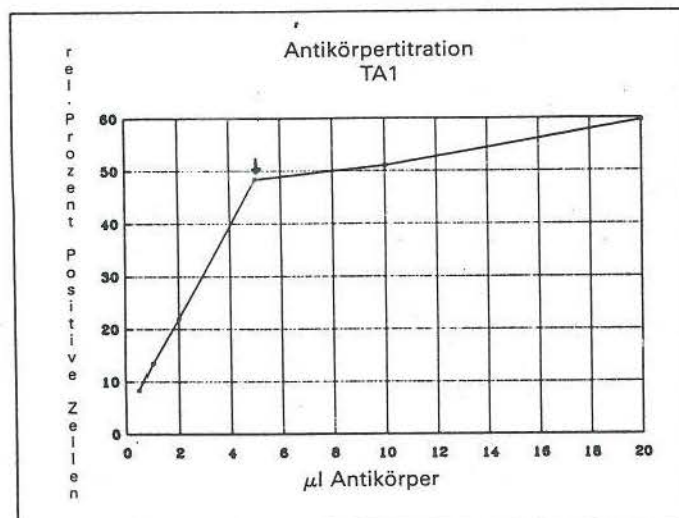
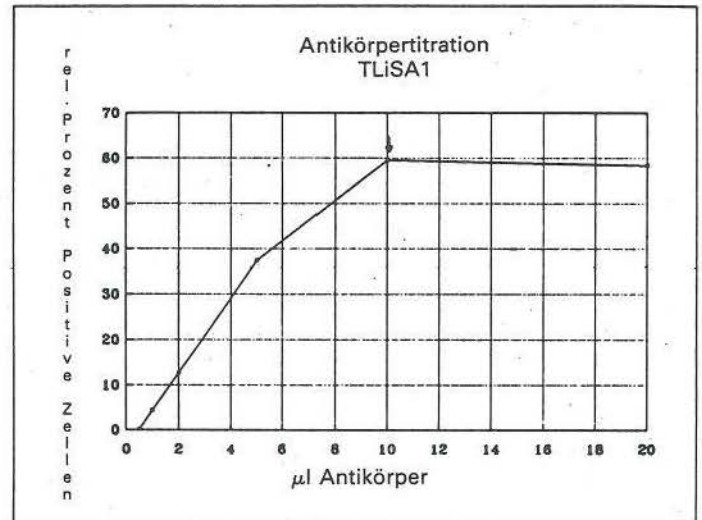
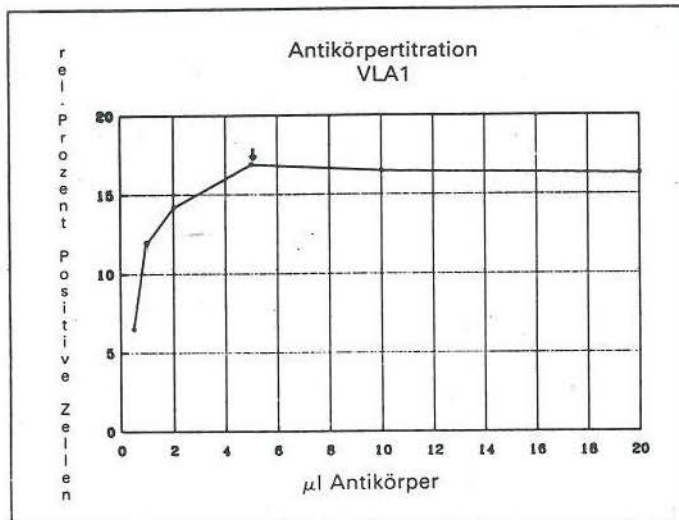


Abb. 1: Titrationskurven von 4 Antikörpern unterschiedlicher Hersteller. Der Pfeil gibt das verwendete Antikörpervolumen an in µl Antikörper pro 100 µl Zellsuspension. Die Antikörper liegen in gelöster Form vor bzw. werden mit dem vom Hersteller angegebenen Volumen gelöst. Bei geringerem Volumen an eingesetzten Zellen werden entsprechend geringere Antikörpervolumina verwendet.

Die Analyse wurde entsprechend dem Analysenprotokoll durchgeführt.

CD57 (Leu-7) NK-Zellen und T-Zellen Subpopulation
TA1 aktivierte T-Zellen
VLA1 „Very Late Activation Antigen“ T-Zellen
TLISA1 „T-Lineage-Specific Activation Antigen“

Verwendete DNS-Farbstoffe:

DAPI = 4,6-Diamidino-2-phenylindol (Fa. Sigma, Deisenhofen).
LDS751 = (Fa. Optilas, Puchheim).

FACS Meßlösung:

PBS: 0,8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ eingestellt auf pH 7,2 oder eine entsprechende kommerzielle Lösung.

FACS-Waschlösung:

PBS mit 5% (v/v) fetalem Kälberserum versetzt oder eine entsprechende kommerzielle Lösung.

Medium für resuspendierte Liquorzellen:

RPMI-1640 (Fa. Biochrom, Berlin). Alle Lösungen, sofern nicht kommerziell erworben, wurden mit einem 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert und mit 0,1% Natriumazid versetzt.

Ergebnisse:

Überlebenszeit der Liquorzellen: Durch Lagerungsexperimente von Liquorlymphozyten in RPMI-1640 oder Eigenserum fand sich ein unterschiedliches Absterbeverhalten der einzelnen T-Zellpopulationen. Binnen 24 Stunden kam es im Vergleich zu den CD4-positiven T-Zellen zu einem schnelleren Absterben der CD8-positiven T-Zellen, was sich in einer Zunahme der CD4/CD8-Ratio widerspiegelte. Die Lagerung im Eigenserum war der Lagerung im RPMI-1640 überlegen. Während nach 24 Stunden im RPMI-1640 im Durchschnitt 55% lebende Lymphozyten nachgewiesen wurden, fanden sich bei Lagerung im Eigenserum 76% lebende Zellen. Die Modifikation unter Verwendung des Farbstoffes DAPI ermöglicht, die Analyse auf lebende Zellen zu beschränken und ist damit der Messung mit anderen DNS-Farbstoffen überlegen.

Abhängigkeit der Analysenqualität von der Durchflußrate: Eine Zunahme des Durchflußdruckes führte zu einer Verschlechterung der Analyseergebnisse. Es zeigte sich eine Verminderung der Empfindlichkeiten der Fluoreszenzen FL1 und FL2 (FITC und PE). Eine Veränderung des Durchflußdruckes während der Analytik ist daher strikt zu vermeiden.

Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration: Die meisten kommerziellen Antikörper sind auf eine bestimmte Zellzahl, in der Regel 1 000 000 Zellen, austitriert. Bei der Liquoranalyse wechselt die Zellzahl von Analyse zu Analyse, liegt aber immer deutlich unter der Zahl von 1 000 000 Zellen. Es ist daher erforderlich, für jeden einzelnen Antikörper durch Titrationsexperimente die optimale Konzentration zu bestimmen (Abb. 1). Da die benötigte Antikörpermenge nicht nur von der Zellzahl, sondern auch vom Probenvolumen und damit der Arbeitskonzentration des Antikörpers abhängig ist (3, 4), ergeben sich für die meisten Antikörper eines Herstellers gleiche Volumina.

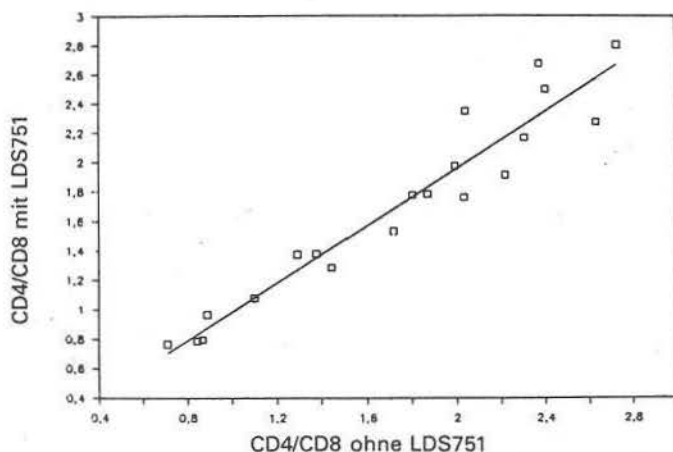


Abb. 2: Regressionsanalyse der CD4/CD8-Ratio. X-Achse = Markierung mit Antikörpern nach Gradientenisolation der mononukleären Zellen ohne Anfärbung der Lymphozyten mit LDS751. Y-Achse = zusätzliche Färbung mit LDS751 der mit CD4- und CD8-markierten Zellen. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist $y = 0,97x + 0,01$; $r = 0,96$.

Richtigkeit der Analysenwerte: Um die Richtigkeit der Resultate der beiden Modifikationen zu überprüfen, wurden periphere Lymphozyten mit der Gradientenmethode nach Boyum (5) isoliert und analysiert und die Ergebnisse mit auf Liquorkonzentration verdünnten Lymphozytensuspensionen verglichen. Abbildung 2 zeigt als Beispiel die Regressionsanalyse für die CD4/CD8-Ratio unter Verwendung der LDS751-Modifikation.

Einfluß des Waschens auf die Markierung: Da Waschen und anschließendes Dekantieren des Überstandes mit gewissen Zellverlusten einhergeht, wäre es wünschenswert, auf das Waschen zu verzichten. Es zeigte sich, daß viele Antikörper zu unspezifischer Bindung neigen. Serienexperimente mit unterschiedlicher Anzahl von Waschzyklen zeigten deutlich, daß auf wenigstens 2 Waschschrte nicht verzichtet werden konnte. Bei einem Antikörper (TA1) waren weitere Waschschrte notwendig, um ein reproduzierbares Resultat zu erhalten (Abb. 3).

Aufnahme der DNS-Farbstoffe in die kernhaltigen Zellen: Abbildung 4 zeigt das Aufnahmeverhalten des Farbstoffes DAPI in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37 °C. Während sich kein Farbstoff in den Erythrozyten anreichte, kam es in den lebenden Lymphozyten zu einer kontinuierlichen Akkumulation von DAPI. Dieses zeitabhängige Verhalten wird dazu benutzt, lebende von toten Zellen zu trennen. In letzteren kommt es durch das Fehlen der Membranbarriere zu einer raschen Aufnahme des Farbstoffes. Der Farbstoff LDS751 zeigte dieses Verhalten nicht. Er wird, auch bei +4 °C, schnell bis zur Sättigung in die Zellen aufgenommen. Die unterschiedliche Bindung an DNS und RNS ist in diesem Zusammenhang unerheblich, da lediglich die kernhaltigen Zellen von den Erythrozyten abzutrennen sind.

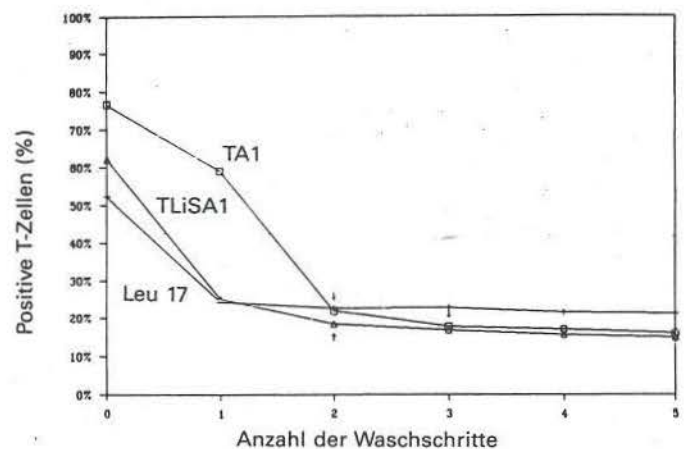


Abb. 3: Auswaschkurven der unspezifisch gebundenen Antikörper. Für den Antikörper TA1 sind 3 Waschschrte bis zum Erreichen eines Plateaus erforderlich. Alle anderen Antikörper werden nur zweimal gewaschen.

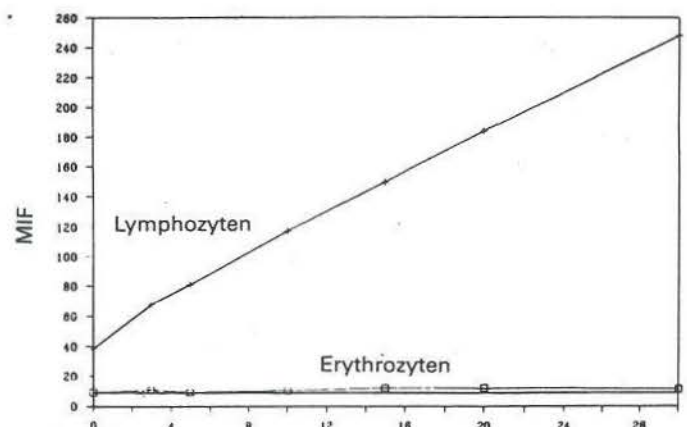


Abb. 4: DAPI-Aufnahme in kernhaltigen Zellen (Lymphozyten +) und kernlose Zellen (Erythrozyten □) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (X-Achse). Die Y-Achse stellt die Fluoreszenzkanalnummer dar. Als Negativkontrolle wurden nicht mit DAPI inkubierte Lymphozyten verwendet.

| Cluster | Liquorlymphozyten | | Blutlymphozyten | | Referenz |
|---------|-------------------|--|-------------------------------|--|----------|
| | \bar{x} | 95%-Bereich relativ % Gesamt- Lymphozyten | \bar{x} | 95%-Bereich relativ % Gesamt- Lymphozyten | |
| n = 24 | | | | | |
| CD4 | 61,0 | 41,0–70,5 | 44,0 | 29,0–59,0 | (6) |
| CD8 | 25,7 | 15,7–42,9 | 33,0 | 19,0–48,0 | (6) |
| Ratio | 2,3 | 1,0–4,2 | 1,4 | 0,6–2,8 | (6) |
| CD3 | 91,2 | 87,3–95,4 | 73,0 | 60,0–85,0 | (6) |
| n < 15 | | | | | |
| | \bar{x} | 90%-Bereich | \bar{x} | 95%-Bereich | |
| CD2 | 94,5 | 90,6–98,7 | 83,0 | 73,0–93,0 | |
| CD19 | 1,7 | 0,3–2,7 | 14,0 | 7,0–23,0 | (6) |
| CD16 | 2,6 | 1,9–3,6 | 14,0 | 6,0–29,0 | (6) |
| CD57 | 11,7 | 5,9–21,5 | 20,0 | 6,0–34,0 | |
| CD45R | 4,4 | 0,7–27,2 | ca. 50 % der CD4+ T-Zellen | | |
| TA1 | 47,7 | 23,4–62,8 | unter 20 % der T-Zellen | | |
| TLISA1 | 17,4 | (17,3–25,5) | chronisch aktivierte T-Zellen | | |
| VLA1 | 5,5 | (2,4–6,4) | chronisch aktivierte T-Zellen | | |

Lysemethode: Für die Elimination von Erythrozyten hat sich bei der Analyse von Vollblut die Lyse der Erythrozyten eingeführt. Eine Anwendung dieses Verfahrens war in einer längeren Versuchsserie nicht erfolgreich, da es parallel zur Lyse der Erythrozyten zu einer Lyse eines Teils der Lymphozyten kam und damit zu einer Verfälschung des Meßergebnisses.

Referenzwerte: Die ersten Untersuchungen zeigten, daß die Werte normaler Liquoren deutlich von den Werten für periphere mononukleäre Zellen abwichen. Eine Zusammenfassung der Resultate ergab nachstehende vorläufige Referenzwerte. Aufgrund der geringen Fallzahlen (unter 15 Proben) konnten bei einigen Markern nur 90%-Bereiche angegeben werden.

Sofern nicht anders angegeben, sind alle Referenzwerte für Lymphozyten des peripheren Blutes den Datenblättern der jeweiligen Antikörperhersteller entnommen.

Charakteristisch für normalen Liquor war, daß der relative Anteil der T-Zellen gegenüber Blut deutlich höher lag. Ebenso zeigte die CD4/CD8-Ratio eine größere Bandbreite als im peripheren Blut. Hierbei muß jedoch der Einfluß der Zählstatistik berücksichtigt werden. Der relative Anteil der aktivierten T-Zellen war ebenfalls höher als im Blut. Hingegen lag die Zahl der B-Zellen deutlich niedriger als im peripheren Blut. Die NK-Zellen zeigten ähnliche Werte wie im Blut.

Bei der Untersuchung von Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose fanden sich signifikante Unterschiede (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney) für CD4, CD8, CD4/CD8-Ratio, NK- und aktivierten T-Zellen. Die Zahl der CD4-positiven Zellen war leicht erhöht, während die Zahl der CD8-positiven T-Suppressorzellen vermindert war, daraus resultierte eine erhöhte CD4/CD8-Ratio. VLA1-positive Zellen waren vermindert.

Diskussion:

Die vorgestellte Methode erlaubt unter Verwendung entsprechender Antikörper eine einfache Analyse jedes im Liquor vorkommenden Zelltyps, sofern entsprechende Marker existieren. Im Gegensatz zur rein morphologischen Analyse sind neben der reinen Typisierung auch zellkinetische oder funktionelle Analysen möglich, also die ganze Palette durchflußzytometrischer Methoden. Beide Modifikationen ergeben identische Resultate unter der Voraussetzung, daß frisches Zellmaterial mit einem hohen Prozentsatz an lebenden Zellen benutzt wird. Der entscheidende Vorzug aber liegt in der Möglichkeit, alle Zellen eines bestimmten Volumens auf das Vorliegen eines Merkmals hin zu untersuchen und damit gegenüber der mikroskopischen Methode eine Steigerung der Nachweisgrenze zu erzielen. Mit geeigneten Geräten ist auch eine Sortierung der Zellen für weitere Experimente möglich.

Wie beim Differentialblutbild unterliegen auch die Resultate den Gesetzen der Binomialverteilung. Die Vertrauensgrenzen der Analyse sind eine Funktion der Zahl der untersuchten Ereignisse. Bei der Liquoranalyse muß daher zwangsläufig auch mit

größeren Streuungen der Resultate gerechnet werden, wenn nur geringe Zellzahlen zur Verfügung stehen.

Die bisher zugänglichen Daten von Liquor-Lymphozytenuntersuchungen bei *Multipler Sklerose* ergeben widersprüchliche Aussagen zu der Frage der T- und B-Zellzahl. In unserem Kollektiv fanden wir keine signifikanten Unterschiede im relativen Anteil der T- und B-Zellen im Vergleich zu normalen Liquorproben. Die ermittelten vorläufigen Referenzwerte stimmen mit den Werten in der Literatur überein (7, 8). Eine erhöhte CD4/CD8-Ratio fand sich ebenfalls. Signifikant war die Verminderung der CD8-positiven Zellen, während die CD4-positiven Zellen nicht signifikant erhöht waren. Andere Autoren berichten von einer Vermehrung der CD4-positiven Zellen und einer ebenso großen Verminderung der CD8-positiven Zellen (9). Die erhöhte Ratio war in Übereinstimmung mit Zaffaroni (10) in den ersten beiden Schüben ausgeprägt. Auch für das Verhalten der NK-Zellen liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor (9). In unserem Kollektiv fand sich im Gegensatz zu Matsui (9) eine signifikante Verminderung der mit CD57- und CD16-markierten NK-Zellen. Die für peripheres Blut beschriebene Abnahme der CD3/CD45R-positiven Lymphozyten hatte im Liquor kein Pendant (11). Allerdings sind alle beschriebenen Veränderungen nicht typisch für die Multiple Sklerose, andere neurologische Erkrankungen zeigen ähnliche Veränderungen der relativen Zellanteile.

Schrifttum:

1. KÖLMEL, H. W.: Atlas of Cerebrospinal Fluid Cells. 2nd Ed. Springer Verlag, Heidelberg (1977).
2. TOELLNER, K.-M.: Lymphozytentypisierung aus Liquor cerebrospinalis mittels fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie. Diplomarbeit. Universität Hohenheim, Biologische Fakultät (1988).
3. DOWER, S. K., OZATO, K., SEGAL, D. M.: The Interaction of Monoclonal Antibodies with MHC Class I Antigens on Mouse Spleen Cells. I. Analysis of the Mechanism of Binding. *Jour. Immunol.*, 123, 751–758 (1984).
4. DOWER, S. K., DELISI, C., TITUS, J. A., SEGAL, D. M.: Mechanism of Binding of Multivalent Immune Complexes to Fc Receptors. I. Equilibrium Binding. *Biochemistry* 20, 6326–6334 (1981).
5. BOYUM, A.: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, (Suppl. 97), 77–89 (1968).
6. Normal Values: Definition of a Reference Range for Lymphocyte Subsets of Healthy Adults. Clinical Monograph No. 1 Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA (1990).
7. HAUSER, S. L., REINHERZ, E. L., HOBAN, C. J., SCHLOSSMAN, S. F., WEINER, H. L.: Immunoregulatory T-Cells and Lymphocytotoxic Antibodies in Active Multiple Sclerosis: Weekly Analysis over a six Month Period. *Ann. Neurol.* 13, 418–425 (1983).
8. KAM-HANSEN, S., FRYDEN, A., LINK, H.: B- and T-Lymphocytes in the Cerebrospinal Fluid and Blood in Multiple Sclerosis, Optic Neuritis and Mumps Meningitis. *Acta Neurol. Scand.* 58, 95–103 (1978).
9. MATSUI, M., MORI, K. J., SAIDA, T., AKIGUCHI, I., KAMEYAMA, M.: The Imbalance in CSF T-Cell Subsets in Active Sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 77, 202–209 (1988).
10. ZAFFARONI, M., CAPUTO, D., GHEZZI, A., CAZZULO, C.: T-Cell Subsets in Multiple Sclerosis: Relationships Between Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid. *Acta Neurol. Scand.* 75, 242–248 (1985).
11. SOBEL, R. A., HAFER, D. A., CASTRO, E. E., MORIMOTO, C., WEINER, H. L.: The 2H4 (CD45R) Antigen is Selectively Decreased in Multiple Sclerosis Lesions. *J. Immunol.* 140, 2210–2214 (1988).

Anschriften der Verfasser:

Dr. med. Holger A. G. Müller
Institut für Laboratoriumsmedizin
Klinik am Eichert
Eichertstr. 3
7320 Göppingen

Kai-Michael Toellner
Inst. f. Genetik und Virologie
Universität Hohenheim
Emil-Wolff-Str. 17
7000 Stuttgart 70

OA Dr. med. Gerhard Hiendlmayer
Klinisch Chemische Abteilung
Bürgerhospital der Stadt Stuttgart
Tunzhoferstr. 14–16
7000 Stuttgart 1